PRACOVNÍ PROTOKOL

Název úlohy: *Detekce přítomnosti DNA geneticky modifikované kukuřice ve vzorku osiva*

Použité přístroje: CFX96 Real-Time PCR systém 5+1plex (f. Biorad)
Centrifuga Z366 (f. Hermle) s rotorem pro 2 destičky na 96 vzorků

Pracovní pomůcky: jednokanálové pipety Nichiryo
spotřební plast – špičky, destičky pro qPCR

Použité chemikálie: detekční kit „foodproof® GMO Screening Kit (f. Biotecon Diagnostics)
připravená škála vzorků genomické DNA s rozdílným zastoupením GM kukuřice (MON810)

Pozn. GM kukuřice (modifikovaný a nemodifikový genotyp) byl poskytnut f. Monsanto Europe na základě uzavřené dohody (Materiál Transfer Agreement). DNA byla izolována kitem DNeasy Plant Mini Kit (f. Qiagen). Koncentrace genomické DNA byla stanovena fluorimetricky. Napěstování mladých rostlin a izolace genomické DNA probíhala v prostorách určených pro práci s GMO na AF MENDELU.

Složení mastermixu (celkový objem 20µl na vzorek):

Pozn. mastermix se zakládá 2x:
1x pro detekce kontrolního rostlinného genu (A)
1x pro detekci 35S/NOS oblasti GM kukuřice (B)

(A)

13 µl	foodproof Plant Gene Master Mix (vialka 1, zelený uzávěr)
1 µl	foodproff GMO Screening Enzyme Solution (vialka 3, červený uzávěr)
1 µl	foodproof GMO Screening Dye Solution (vialka 6, bílý uzávěr)
15 µl	CELKOVÝ OBJEM

(B)

13 µl	foodproof 35S/NOS Master Mix (vialka 1, žlutý uzávěr)
1 µl	foodproff GMO Screening Enzyme Solution (vialka 3, červený uzávěr)
1 µl	foodproof GMO Screening Dye Solution (vialka 6, bílý uzávěr)
15 µl	CELKOVÝ OBJEM

Mastermix se připravuje v celkovém objemu, který se rovná počtu vzorků+2 (pro A i B variantu):

- rozpipetování do jednotlivých jamek (PCR zkumavek nebo stripů)
- přidání: 5 µl zájmových vzorků
  5 µl H_2O (PCR-grade) – tzv. negativní kontrola
  5 µl foodproof GMO Screening Control Template (vialka 4, růžový uzávěr)

Centrifugace: 1.500 g po dobu 30 s

Popis vzorků v ovládacím programu.

Pracovní protokol využívá přístrojové vybavení pořízené z rozvojového projektu FRVŠ MŠMT č. 1351/2010/Aa s názvem „***Rozvoj molekulárně-biologické laboratoře pro praktickou výuku studentů***“

Umístění vzorků do přístroje a spuštění příslušného PCR teplotního a časového protokolu:

1x		
Segment1	37°C	120 s
Segment2	95°C	600 s

45x		
Segment1	95°C	10 s
Segment2	60°C	30 s
Segment3	72°C	15 s

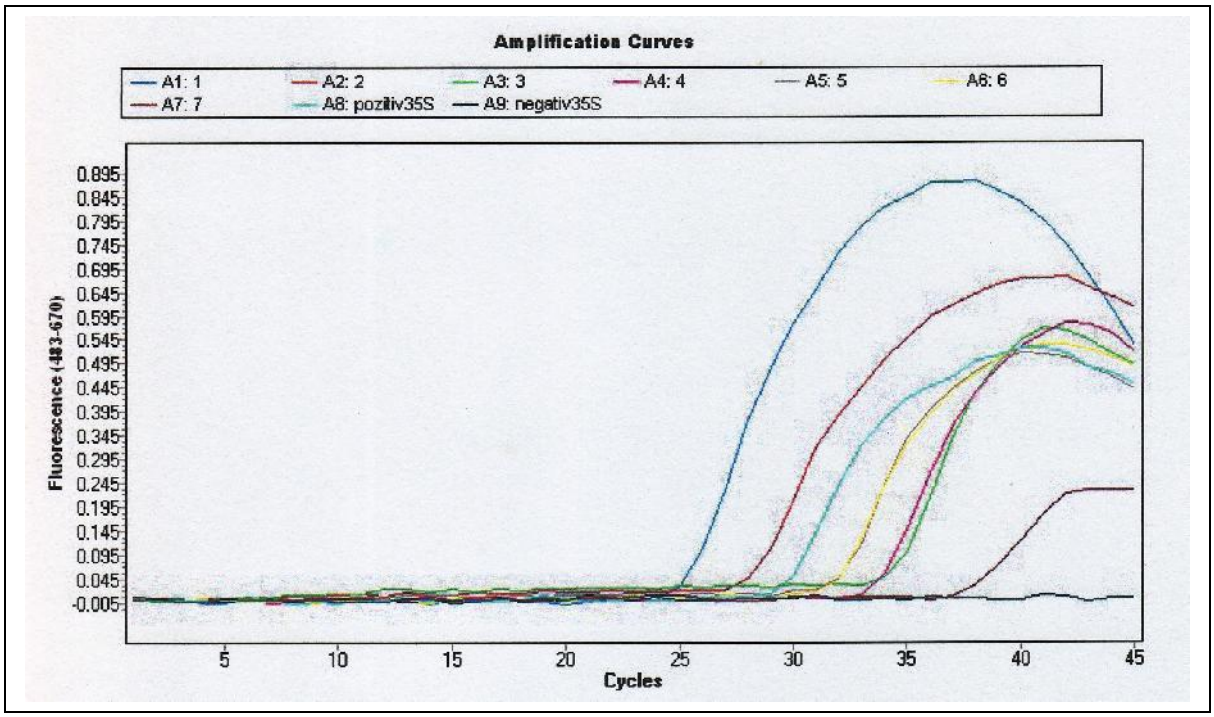
1x		
Segment1	40°C	30 s

Vyhodnocení výsledků detekce na jednotlivých kanálech:

Plant Gene	kanál 610
NOS-terminátor	kanál 610
35S-promotor	kanál 660/670

Vyhodnocení analýz je realizována za pomocí ovládacího a vyhodnocovacího software, který je standardním příslušenstvím zařízení.

Absolutní kvantifikace pomocí druhé derivace

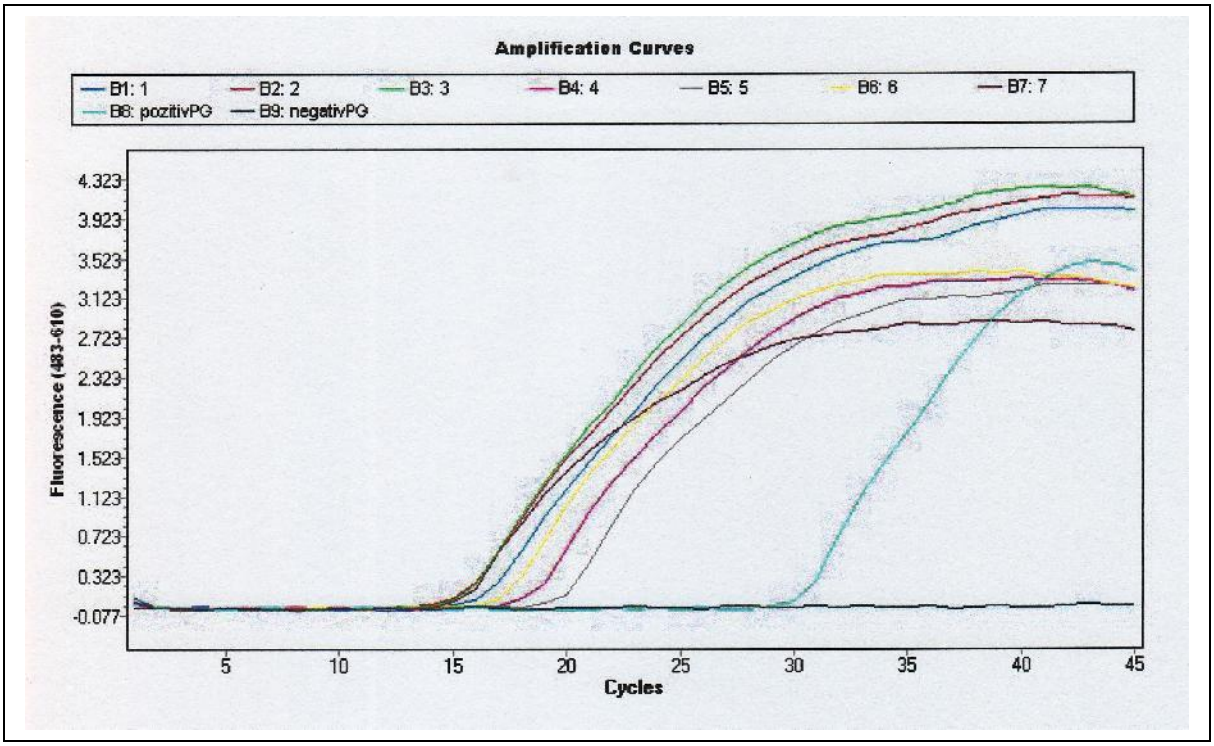


Ukázka křivky amplifikace sond na 35S-promotor

Vzorek	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
CP	24.44	26.06	33.97	33.21	31.19	31.05	37.02	29.09	

CP hodnota – hodnota crossing pointu

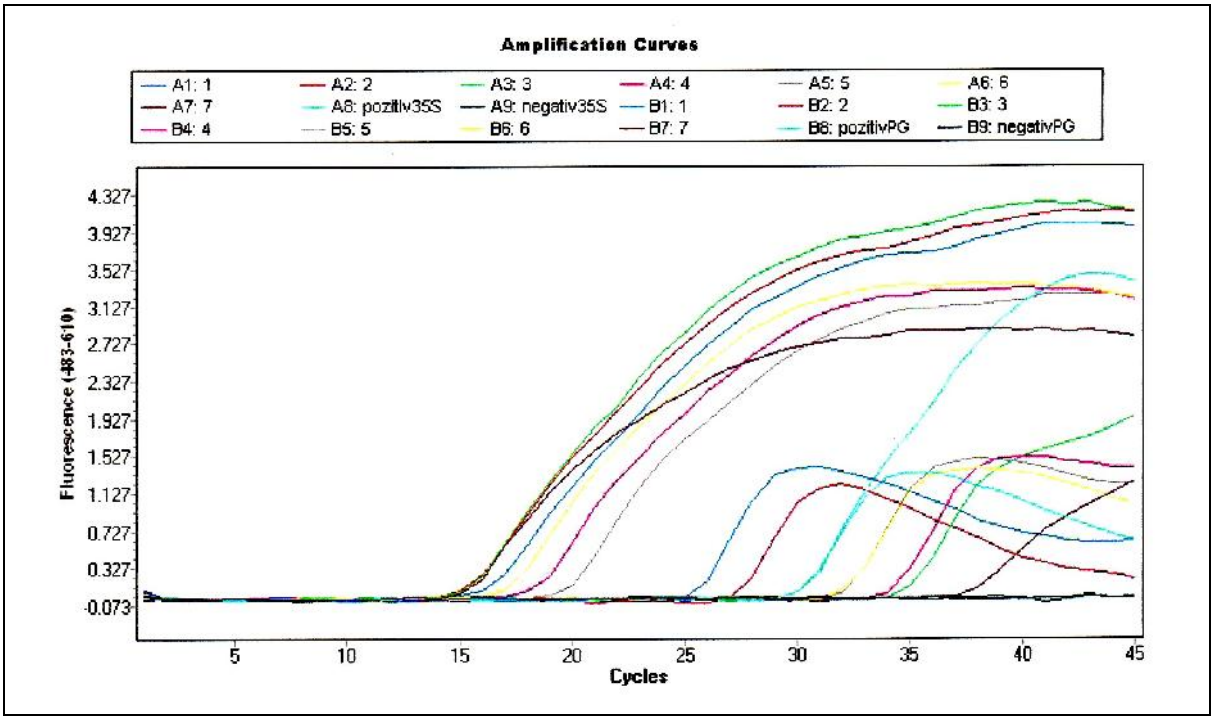
Pracovní protokol využívá přístrojové vybavení pořízené z rozvojového projektu FRVŠ MŠMT č. 1351/2010/Aa s názvem „***Rozvoj molekulárně-biologické laboratoře pro praktickou výuku studentů***“



Ukázka křivky amplifikace sond na PG

Vzorek	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9
CP	15.97	15.06	15.08	17.97	19.24	16.77		29.90	

CP hodnota – hodnota crossing pointu



Ukázka křivky amplifikace sond na 35S a PG

Vzorek	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
CP	24.44	26.06	33.97	33.21	31.19	31.05	37.02	29.09	
Vzorek	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9
CP	15.97	15.06	15.08	17.97	19.24	16.77		29.90	

CP hodnota – hodnota crossing pointu

Pracovní protokol využívá přístrojové vybavení pořízené z rozvojového projektu FRVŠ MŠMT č. 1351/2010/Aa s názvem „***Rozvoj molekulárně-biologické laboratoře pro praktickou výuku studentů***“